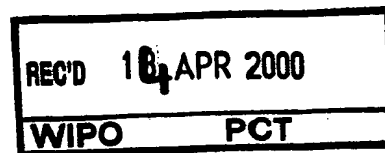




FR00/714



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le **07 FEV. 2000**

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30



REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Réservé à l'INPI

| | | | |
|---|--|--|--|
| DATE DE REMISE DES PIÈCES 22 MARS 1999 N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL 99 03700 - DÉPARTEMENT DE DÉPÔT 42 DATE DE DÉPÔT 22 MARS 1999 | | 1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE RHONE-POULENC AGRO Franck TETAZ - DPI B.P. 9163 69263 LYON CEDEX 09 n° du pouvoir permanent 6229 références du correspondant PH 99014 téléphone 33 4 72 85 25 0 | |
| 2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle <input checked="" type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> demande divisionnaire <input type="checkbox"/> certificat d'utilité <input type="checkbox"/> transformation d'une demande de brevet européen <input type="checkbox"/> demande initiale <input type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> certificat d'utilité n° _____ date _____ | | Établissement du rapport de recherche <input type="checkbox"/> différé <input checked="" type="checkbox"/> immédiat Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non | |
| Titre de l'invention (200 caractères maximum) "Promoteur inductible COMTII, gène chimère le comprenant et plantes transformées" | | | |
| 3 DEMANDEUR (S) n° SIREN _____ code APE-NAF _____ Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination RHONE-POULENC AGRO | | Forme juridique S.A. | |
| Nationalité (s) française Adresse (s) complète (s) 14-20 rue Pierre Baizet 69009 LYON | | Pays France | |
| 4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs <input type="checkbox"/> oui <input checked="" type="checkbox"/> non En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre <input type="checkbox"/> Si la réponse est non, fournir une désignation séparée | | | |
| 5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES <input type="checkbox"/> requise pour la 1ère fois <input type="checkbox"/> requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission | | | |
| 6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE pays d'origine _____ numéro _____ date de dépôt _____ nature de la demande _____ | | | |
| 7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n° _____ date _____ n° _____ date _____ | | | |
| 8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (nom et qualité du signataire) Franck TETAZ | | SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION A. CHAPELAN SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI | |

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DEPARTEMENT DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg

75800 Paris Cédex 08

Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

69903700

(N/Réf : PH 99014)

TITRE DE L'INVENTION :

"Promoteur inductible COMTII, gène chimère le comprenant et plantes transformées"

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

Franck TETAZ
RHONE-POULENC AGRO

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

TOQUIN Valérie
1, rue Henri Barbusse
Saint Martin des Champs
29600 MORLAIX, France

GEOFFROY Pierrette
10, rue Fischart
67000 STRASBOURG, France

FRITIG Bernard
6, rue du Hohwald
67460 SOUFFELWEYERSHEIM, France

LEGRAND Michel
3, rue des Roses
67370 PFETTISHEIM, France

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire
Lyon, le 22 Mars 1999

Franck TETAZ

Promoteur inductible COMTII, gène chimère le comprenant et plantes transformées

La présente invention concerne une nouvelle séquence de régulation promotrice inductible en réponse à une blessure, mécanique ou chimique, ou en réponse à une
5 agression par un agent pathogène, notamment bactérien, fongique ou viral, ou par un insecte ou un nématode.

La présente invention concerne également un gène chimère (ou cassette d'expression) comprenant la séquence de régulation promotrice selon l'invention qui contrôle l'expression d'une séquence codante hétérologue, hétérologue signifiant ici une
10 séquence codante différente de la séquence codante native.

La présente invention concerne également un organisme hôte comprenant ledit gène chimère, les plantes transformées le comprenant et les semences (graines) desdites plantes transformées.

Il est connu de l'état de la technique que certains gènes, silencieux en l'absence
15 d'agression, ne sont activés que par une agression tant mécanique que chimique et/ou en réponse à une agression par un agent pathogène, un insecte ou un nématode. De tels gènes et leurs facteurs d'activation sont notamment décrits dans le brevet US 5 670 349.

Ces différents modes de défense sont généralement liés à une régulation de l'expression de certains gènes impliqués dans les mécanismes de défense des plantes par
20 induction de leurs séquences de régulation promotrices. On connaît plusieurs séquences de régulation inductibles comme les promoteurs de phénylalanine ammoniac lyase (PAL), d'HMG-CoA reductase (HMG), de chitinases, de glucanases, d'inhibiteurs de protéinase (PI), de gènes de la famille PR1, de la nopaline synthase (nos) ou du gène vspB, tous ces promoteurs étant rappelés avec les références des publications
25 correspondantes par le Tableau 3 du brevet US 5 670 349. On connaît également le promoteur HMG2 décrit dans ce même brevet US 5 670 349, comme le promoteur de la beta-galactosidase (ABG1) de pomme ou le promoteur de l'amino cyclopropane carboxylate syntase (ACC synthase) de pomme décrits dans la demande de brevet WO 98/45445.

30 La présente invention concerne un nouveau fragment d'acide nucléique isolé comprenant un promoteur de plante (ou séquence de régulation promotrice) inductible, ledit promoteur étant constitué par le promoteur d'un gène d'O-méthyltransférase de

classe II (ci-après COMT II) de plante.

Les gènes d'*O*-méthyltransférase de classe II, dont le gène d'acide caféique-*O*-méthyltransférase de classe II, de plantes sont silencieux (inactifs) en l'absence de toute agression puisque les plantes non agressées ne l'expriment pas, ou pour le moins à des
 5 niveaux indétectables par les méthodes d'analyse usuelles. Ainsi, le messenger de la COMT II est indétectable par la technique de "Northern blot" dans différents tissus d'une plante saine non traitée, comme par exemple le tabac (Pellegrini & al., 1993). Cette COMTII et son promoteur sont activés (ou induits) par les blessures, les infections virales, les agressions aux rayons UV, ou aux agressions chimiques par différents
 10 produits comme le benzothiazole (BTH), le méthyle jasmonate ou des éliciteurs d'origine végétale comme la pectine.

De manière avantageuse, le fragment d'acide nucléique isolé selon l'invention est constitué par un promoteur de COMTII de plante.

Par COMTII de plante, on entend selon l'invention toute OMT de plante qui n'est
 15 pas exprimée dans les plantes saines non traitées, mais qui l'est à la suite d'une agression mécanique, chimique, par un pathogène, un insecte ou un nématode.

Par plante d'origine de la COMTII, on entend selon l'invention tout organisme pluricellulaire différencié capable de photosynthèse, qu'elle soit monocotylédone ou dicotylédone, comme par exemple le riz, le blé, l'orge, le tournesol, le maïs, le tabac, le
 20 colza, le soja ou *Arabidopsis thaliana*.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, la COMT II est une COMT de plante dicotylédone, de préférence de tabac.

Par promoteur, on entend selon l'invention la région non codante d'un gène impliqué dans la liaison avec l'ARN polymérase et d'autres facteurs qui sont
 25 responsables de l'initiation et de la modulation de la transcription conduisant à la production d'un transcrit d'ARN. Il s'agit plus particulièrement de toute séquence en 5' du site d'initiation de la traduction ou codon "start" (ATG) de la séquence codante de la COMTII permettant la transcription et l'expression de ladite séquence codante.

Le promoteur selon l'invention comprend avantageusement une séquence de plus
 30 de 600 nucléotides en amont de l'ATG de la COMT II, de préférence de plus de 1000 nucléotides en amont de l'ATG, plus préférentiellement de plus de 1200 nucléotides en amont de l'ATG.

Le promoteur comprend un site d'initiation de la transcription. Le site d'initiation de la transcription est généralement situé à moins de 100 nucléotides en amont de l'ATG, avantageusement à environ 90 nucléotides en amont.

De manière avantageuse, l'extrémité 3' du promoteur COMTII selon l'invention
5 est située entre le site d'initiation de la transcription et l'ATG. De préférence, l'extrémité 3' du promoteur COMTII est située entre 10 et 50 nucléotides en aval du site d'initiation de la transcription, plus préférentiellement entre 20 et 40 nucléotides en aval, encore plus préférentiellement entre 20 et 30 nucléotides en aval.

Le promoteur COMTII selon l'invention comprend également au moins une boîte
10 TATA et au moins une boîte CAT. La boîte TATA est généralement située à moins de 50 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription, à environ 40 nucléotides en amont. La boîte CAT est généralement située à moins de 100 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription, de préférence à environ 100 nucléotides et/ou 80 nucléotides en amont. De manière avantageuse, le promoteur comprend deux boîtes
15 CAT.

Le promoteur selon l'invention comprend également des éléments régulateurs impliqués dans l'expression de gènes du métabolisme des phénylpropanoïdes et des gènes associés à la défense, en particulier au moins une boîte A et/ou au moins une boîte L et/ou au moins une boîte L inversée et/ou au moins une boîte P et/ou au moins une
20 boîte W inversée. La boîte A comprend la séquence suivante CCGTCC. Elle est généralement située à moins de 410 nucléotides du site d'initiation de la transcription. La boîte L comprend la séquence suivante CTTCAACAACCAACC. Elle est généralement située à moins de 180 nucléotides du site d'initiation de la transcription. La première boîte L inversée comprend la séquence suivante GTTAGGTGAAG. Elle
25 est généralement située à moins de 1000 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription. Avantageusement, le promoteur selon l'invention comprend deux boîtes L inversées, l'une à environ 970 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription et l'autre à environ 440 nucléotides en amont. La deuxième boîte L inversée comprend la séquence suivante TGTTAGGTGTGTGTTT. La boîte P
30 comprend la séquence suivante CACACCAACTCCCA. Elle est généralement située à moins de 750 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription. La boîte W inversée comprend la séquence suivante GGTCAG. Elle est généralement située à

moins de 1200 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription. Avantageusement, le promoteur selon l'invention comprend deux boîtes W inversées, l'une à environ 1110 nucléotides en amont et l'autre à environ 210 nucléotides en amont.

5 Le promoteur selon l'invention comprend également au moins une boîte E et/ou au moins une boîte G et/ou au moins une boîte GT. La boîte E comprend la séquence suivante TTCCATCAAG. Elle est généralement située à moins de 110 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription. La boîte G comprend la séquence suivante CCACGT. Elle est généralement située à moins de 600 nucléotides en amont du site
10 d'initiation de la transcription. La boîte GT comprend la séquence suivante GGTAA. Elle est généralement située à moins de 450 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription. Avantageusement, le promoteur selon l'invention comprend deux boîtes GT, l'une à environ 400 nucléotides en amont et l'autre à environ 280 nucléotides en amont.

15 Selon un mode avantageux de réalisation de l'invention, le promoteur selon l'invention est constitué par le promoteur COMTII de tabac défini par la séquence nucléotidique en amont de l'ATG représentée par l'identificateur de séquence 1 (SEQ ID NO 1), de préférence la séquence comprise entre les nucléotides 557 et 1795 de l'identificateur de séquence n° 1, et leurs séquences homologues. Par séquence
20 homologue, on entend selon l'invention toute séquence comprenant plus de 70 % d'homologie, préférentiellement plus de 80 % d'homologie, encore plus préférentiellement plus de 90 % d'homologie, et qui conserve les éléments fonctionnels du COMTII lui conférant ses propriétés de promoteur inductible.

L'isolement, le clonage et la caractérisation des promoteurs COMT II à partir des
25 gènes de COMT II se fait selon les méthodes expérimentales usuelles de l'homme du métier pour isoler, cloner et caractériser un promoteur, abondamment décrites dans la littérature.

L'isolement et le clonage d'un gène COMT II se fait par analyse d'une banque génomique préparée à partir de l'ADN de la plante d'intérêt. L'ADN génomique est
30 coupée par une ou plusieurs enzymes de restriction appropriées et introduit dans un vecteur adéquat pour constituer, par des méthodes connues de l'homme du métier, une banque contenant l'ensemble du DNA génomique de la plante (Ausubel et al., 1998;

Sambrook et al., 1989).

Le ou les clones renfermant un gène COMT II est (sont) isolé(s) grâce à une sonde nucléotidique. La séquence de la sonde est, soit déduite de la séquence protéique si l'enzyme a été purifiée (en suivant son activité, par exemple), soit préparée à partir d'un clone de cDNA issu d'une banque. Cette banque de cDNA est préparée à partir de mRNA extrait de tissus traités de façon à induire l'expression du gène COMT II (par la blessure, l'infection ou un traitement chimique comme décrit dans les exemples ou les figures 1-5). La banque de cDNA est ensuite criblée par des anticorps dirigés contre une protéine COMT II (de tabac par exemple) ou par une sonde nucléotidique déduite de la protéine COMT II de la plante considérée ou déduite des séquences conservées chez les COMT de plantes. Le cDNA ainsi isolé est caractérisé par sa séquence nucléotidique ou par l'activité enzymatique de la protéine recombinante obtenue après expression du cDNA dans un organisme procaryote ou eucaryote.

Les séquences non codantes du cDNA (3' et/ou 5') sont utilisées pour sélectionner, par PCR, en conditions très sélectives, le ou les clones génomiques renfermant le gène COMT II exprimé lors du traitement utilisé pour construire la banque cDNA. Les séquences promotrices sont alors être isolées par PCR ou toute autre méthode appropriée bien connue de l'homme du métier.

Sur la base des informations contenues dans la présente demande de brevet pour le promoteur COMTII de tabac, l'homme du métier sera à même d'identifier d'autres promoteurs COMTII d'autres espèces végétales une fois le gène COMTII identifié et cloné selon les méthodes usuelles, notamment celles décrites ci-dessus.

La présente invention concerne également un gène chimère (ou cassette d'expression) fonctionnel dans les cellules végétales et les plantes comprenant dans le sens de la transcription une séquence de régulation en 5', une séquence codante et une séquence de régulation en 3', la séquence de régulation en 5' comprenant un promoteur COMT II selon l'invention défini auparavant.

Par "cellule végétale", on entend selon l'invention toute cellule issue d'une plante et pouvant constituer des tissus indifférenciés tels que des cals, des tissus différenciés tels que des embryons, des parties de plantes, des plantes ou des semences.

On entend par "plante" selon l'invention, tout organisme multicellulaire différencié capable de photosynthèse, en particulier monocotylédones ou dicotylédones,

plus particulièrement des plantes de culture destinées ou non à l'alimentation animale ou humaine, comme le maïs, le blé, le colza, le soja, le riz, la canne à sucre, la betterave, le tabac, le coton, etc.

Comme séquence de régulation en 5', on peut utiliser le promoteur COMTII selon l'invention seul ou associé à au moins une partie d'un promoteur d'un gène s'exprimant naturellement dans les plantes en particulier un promoteur s'exprimant notamment dans les feuilles des plantes, comme par exemple des promoteurs dits constitutifs d'origine bactérienne, virale ou végétale ou encore des promoteurs dits lumière dépendants comme celui d'un gène de la petite sous-unité de ribulose- biscarboxylase/oxygénase (RuBisCO) de plante ou tout promoteur convenable connu pouvant être utilisé. Parmi les promoteurs d'origine végétale on citera les promoteurs d'histone tels que décrits dans la demande EP 0 507 698, ou le promoteur d'actine de riz (US 5,641,876). Parmi les promoteurs d'un gène de virus de plante, on citera celui de la mosaïque du choux fleur (CAMV 19S ou 35S), ou le promoteur du circovirus (AU 689 311).

On peut encore utiliser le promoteur COMTII selon l'invention en association avec au moins une partie d'un promoteur spécifique de régions ou de tissus particuliers des plantes, et plus particulièrement des promoteurs spécifiques des graines ([22] Datla, R. & al., Biotechnology Ann. Rev. (1997) 3, 269-296), notamment les promoteurs de la napine (EP 255 378), de la phaseoline, de la glutenine, de l'héliantinine (WO 92/17580), de l'albumine (WO 98/45460) ou de l'oélosine (WO 98/45461).

Selon l'invention, on peut également utiliser, en association avec le promoteur COMTII selon l'invention, d'autres séquences de régulation, qui sont situées entre le promoteur et la séquence codante, telles que des activateurs de transcription ("enhancer"), comme par exemple l'activateur de translation du virus de la mosaïque du tabac (VMT) décrit dans la demande WO 87/07644, ou du virus etch du tabac (VET) décrit par Carrington & Freed.

Comme séquence de régulation terminatrice ou de polyadénylation, on peut utiliser toute séquence correspondante d'origine bactérienne, comme par exemple le terminateur nos d'*Agrobacterium tumefaciens*, ou encore d'origine végétale, comme par exemple un terminateur d'histone tel que décrit dans la demande EP 0 633 317.

La séquence codante du gène chimère selon l'invention comprend une séquence codante pour un gène rapporteur, comme la séquence codante GUS, ou une séquence

codante pour une protéine d'intérêt. Au regard du mode d'induction du promoteur selon l'invention, blessure, infection virale ou réponse à des éliciteurs, la protéine d'intérêt est avantageusement une protéine conférant aux plantes des propriétés de résistance aux maladies ou aux insectes.

5 Parmi les protéines ou peptides d'intérêt conférant de nouvelles propriétés de résistance aux maladies on citera notamment les chitinases, les glucanases, l'oxalate oxydase, toutes ces protéines et leurs séquences codantes étant largement décrites dans la littérature, ou encore les peptides antibactériens et/ou antifongiques, en particulier les peptides de moins de 100 acides aminés riches en cystéines comme les thionines ou
10 défensines de plantes, et plus particulièrement les peptides lytiques de toutes origines comprenant un ou plusieurs ponts disulfures entre les cystéines et des régions comprenant des acides aminés basiques, notamment les peptides lytiques suivants : l'androctonine (WO 97/30082 et PCT/FR98/01814, déposée le 18 août 1998) ou la drosomicine (PCT/FR98/01462, déposée le 8 juillet 1998).

15 Parmi les protéines d'intérêt conférant de nouvelles propriétés de résistance aux insectes, on citera plus particulièrement les protéines *Bt* largement décrites dans la littérature et bien connues de l'homme du métier. On citera aussi les protéines extraites de bactéries comme *Photorabdus* (WO 97/17432 & WO 98/08932).

La présente invention concerne également un vecteur de clonage et/ou
20 d'expression pour la transformation des cellules végétales ou des plantes contenant au moins un gène chimère tel que défini ci-dessus. Ce vecteur comprend outre le gène chimère ci-dessus, au moins une origine de réplication. Ce vecteur peut être constitué par un plasmide, un cosmide, un bactériophage ou un virus, transformés par l'introduction du gène chimère selon l'invention. De tels vecteurs de transformation
25 sont bien connus de l'homme du métier et largement décrits dans la littérature. Pour la transformation des cellules végétales ou des plantes, il s'agira notamment d'un virus qui peut être employé pour la transformation des plantes développées et contenant en outre ses propres éléments de réplication et d'expression. De manière préférentielle, le vecteur de transformation des cellules végétales ou des plantes selon l'invention est un
30 plasmide.

Pour la transformation des cellules végétales ou des plantes, le gène chimère selon l'invention peut être employé en association avec un gène marqueur de sélection, soit

dans un même vecteur, les deux gènes étant associés de manière convergente, divergente ou colinéaire, ou encore dans deux vecteurs employés simultanément pour la transformation de l'organisme hôte. De tels gènes marqueurs et leur utilisation pour la transformation des plantes sont bien connus de l'homme du métier et largement décrits dans la littérature.

Parmi les gènes codant pour des marqueurs de sélection, on peut citer les gènes de résistance aux antibiotiques, les gènes de tolérance aux herbicides (bialaphos, glyphosate ou isoxazoles), des gènes codant pour des enzymes rapporteurs facilement identifiables comme l'enzyme GUS, des gènes codant pour des pigments ou des enzymes régulant la production de pigments dans les cellules transformées. De tels gènes marqueurs de sélection sont notamment décrits dans les demandes de brevet EP 242 236, EP 242 246, GB 2 197 653, WO 91/02071, WO 95/06128, WO 96/38567 ou WO 97/04103.

L'invention a encore pour objet un procédé de transformation des cellules végétales par intégration au génome des dites cellules végétales d'au moins un gène chimère tel que défini ci-dessus, transformation qui peut être obtenue par tout moyen connu approprié, amplement décrit dans la littérature spécialisée et notamment les références citées dans la présente demande, plus particulièrement par le vecteur selon l'invention.

Une série de méthodes consiste à bombarder des cellules, des protoplastes ou des tissus avec des particules auxquelles sont accrochées les séquences d'ADN. Une autre série de méthodes consiste à utiliser comme moyen de transfert dans la plante un gène chimère inséré dans un plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* ou Ri d'*Agrobacterium rhizogenes*. D'autres méthodes peuvent être utilisées telles que la micro injection ou l'électroporation, ou encore la précipitation directe au moyen de PEG. L'homme du métier fera le choix de la méthode appropriée en fonction de la nature de l'organisme hôte, en particulier de la cellule végétale ou de la plante.

La présente invention a encore pour objet les cellules végétales ou plantes transformés et contenant un gène chimère défini ci-dessus.

La présente invention a encore pour objet les plantes contenant des cellules transformées, en particulier les plantes régénérées à partir des cellules transformées. La régénération est obtenue par tout procédé approprié qui dépend de la nature de l'espèce,

comme par exemple décrit dans les références ci-dessus. Pour les procédés de transformation des cellules végétales et de régénération des plantes, on citera notamment les brevets et demandes de brevet suivants: US 4,459,355, US 4,536,475, US 5,464,763, US 5,177,010, US 5,187,073, EP 267,159, EP 604 662, EP 672 752, US 5 4,945,050, US 5,036,006, US 5,100,792, US 5,371,014, US 5,478,744, US 5,179,022, US 5,565,346, US 5,484,956, US 5,508,468, US 5,538,877, US 5,554,798, US 5,489,520, US 5,510,318, US 5,204,253, US 5,405,765, EP 442 174, EP 486 233, EP 486 234, EP 539 563, EP 674 725, WO 91/02071 et WO 95/06128.

La présente invention concerne également les plantes transformées issues de la culture et/ou du croisement des plantes régénérées ci-dessus, ainsi que les graines de plantes transformées.

Les plantes transformées pouvant être obtenues selon l'invention peuvent être du type monocotylédones telles que par exemple les céréales, la canne à sucre, le riz et le maïs ou dicotylédones comme par exemple le tabac, la soja, le colza, le coton, le tournesol, la betterave, le trèfle, etc.

Les plantes transformées selon l'invention peuvent contenir d'autres gènes d'intérêt, conférant aux plantes de nouvelles propriétés agronomiques. Parmi les gènes conférant de nouvelles propriétés agronomiques aux plantes transformées, on peut citer les gènes conférant une tolérance à certains herbicides, ceux conférant une tolérance à certains insectes, ceux conférant une tolérance à certaines maladies. De tels gènes sont notamment décrits dans les demandes de brevet WO 91/02071 et WO 95/06128. On peut également citer les gènes modifiant la constitution des plantes modifiées, en particulier la teneur et la qualité de certains acides gras essentiels (EP 666 918) ou encore la teneur et la qualité des protéines, en particuliers dans les feuilles et/ou les graines desdites plantes. On citera en particulier les gènes codant pour des protéines enrichies en acides aminés soufrés ([1]; WO 98/20133 ; WO 97/41239 ; WO 95/31554 ; WO 94/20828 ; WO 92/14822). Ces protéines enrichies en acides aminés soufrés auront également pour fonction de piéger et stocker la cystéine et/ou la méthionine excédentaire, permettant d'éviter les problèmes éventuels de toxicité liés à une surproduction de ces acides aminés soufrés en les piégeant. On peut citer également des gènes codant pour des peptides riches en acides aminés soufrés et plus particulièrement en cystéines, les dits peptides ayant également une activité antibactérienne et/ou

antifongique. On citera plus particulièrement les défensines de plantes, de même que les peptides lytiques de toute origine, et plus particulièrement les peptides lytiques suivants : l'androctonine (WO 97/30082 et PCT/FR98/01814, déposée le 18 août 1998) ou la drosomicine (PCT/FR98/01462, déposée le 8 juillet 1998).

5 Ces autres gènes d'intérêt peuvent être combinés au gène chimère selon l'invention soit par croisement conventionnel de deux plantes contenant chacune l'un des gènes (la première le gène chimère selon l'invention et la seconde le gène codant pour la protéine d'intérêt) soit en effectuant la transformation de cellules végétales d'une plante contenant le gène codant pour la protéine d'intérêt avec le gène chimère
10 selon l'invention.

Les exemples ci-après permettent d'illustrer l'invention, sans toutefois chercher à en limiter la portée.

Toutes les méthodes ou opérations décrites ci-dessous dans ces exemples sont données à titre d'exemples et correspondent à un choix, effectué parmi les différentes
15 méthodes disponibles pour parvenir au même résultat. Ce choix n'a aucune incidence sur la qualité du résultat et par conséquent, toute méthode adaptée peut être utilisée par l'homme de l'art pour parvenir au même résultat. La plupart des méthodes d'ingénierie des fragments d'ADN sont décrites dans "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes 1 et 2, Ausubel F.M. et al ou dans Sambrook et al 1989.

20 Description de la figure 1 : Cinétiques d'activités GUS (1A) correspondant à la construction promoteur COMTII(-1215 à +24)/GUS et COMTII (1B) au cours d'une infection virale (VMT) ou lors d'une blessure.

Exemple 1 : Isolement du gène COMT de classe II

Le criblage d'une banque génomique de tabac a permis d'isoler 6 clones différents
25 contenant des gènes de COMT de classe II (COMTII). Ces derniers ont d'abord été caractérisés par leurs profils de restriction qui ont révélé une certaine hétérogénéité parmi les différents clones.

Les COMTII forment une famille multigénique composée de six à sept gènes dont un seul est transcrit dans les réactions de défense puisqu'un seul type d'ADNc a été
30 caractérisé dans une banque élaborée à partir de feuilles inoculées par le virus de la mosaïque du tabac (VMT) (Pellegrini & al. 1993). Afin d'identifier le ou les clones renfermant le gène exprimé lors des réactions de défense, des réactions PCR ont été

réalisées en utilisant des amorces dérivées de la région 3' non codante de l'ADNc. Dans des conditions de sélectivité élevée un seul clone est alors amplifié. Les produits d'amplifications ont été séquencés. Les séquences obtenues ont présenté une homologie parfaite avec celles des régions 3' non codantes de l'ADNc.

5

Exemple 2 : Analyse des séquences du promoteur de gène de la COMT de classe II

Le clone génomique retenu a été sous-cloné dans un vecteur bactérien (puc 18) et représente un insert de 14 kb dont 9 kb sont situés en amont de l'ATG du gène COMTII.

10 Le site d'initiation de la transcription a été déterminé par la technique d'extension d'amorce et il se place à 90 nucléotides du site d'initiation de la traduction.

Le promoteur a été séquencé sur une longueur de 1771 kilobases. Des éléments non spécifiques et communs aux gènes eucaryotes impliqués dans l'initiation de la transcription tels la TATA box et la CAT box ont été retrouvés dans le promoteur
15 COMTII (SEQ ID NO 1). Des sites de régulation ont été mis en évidence par comparaison des séquences promotrices du gène COMTII avec celles de gènes intervenant dans les mécanismes de défense. Le promoteur COMTII contient des éléments spécifiques des gènes du métabolisme des phénylpropanoïdes impliqués dans la réponse au stress comme les trois boîtes P, A, L (initialement identifiées dans le gène
20 PAL de persil) (SEQ ID NO 1). Ces trois boîtes sont impliquées dans la réponse aux éliciteurs et les boîtes P et L sont également impliquées dans la réponse aux UV. La boîte E initialement identifiée dans le gène de la CCoAOMT de persil et extrêmement conservée dans les gènes du métabolisme des phénylpropanoïdes joue aussi un rôle dans la réponse aux éliciteurs.

25 Le promoteur COMTII possède également des éléments jouant un rôle important dans l'induction de gènes PR par les éliciteurs telle la boîte W (SEQ ID NO 1).

Des éléments régulateurs généraux sont retrouvés dans le promoteur de la COMTII telles les boîtes G, GT et l'élément activateur du virus simiens SV40 (SEQ ID NO 1). La boîte G est un élément présent dans une grande variété de promoteurs
30 végétaux. La boîte G, associée à des éléments cis spécifiques, est impliquée dans la régulation de nombreux gènes répondant à différents signaux physiologiques et environnementaux. La région promotrice, responsable de la régulation de gènes par le

méthyle jasmonate, est constituée d'une boîte G associée à des séquences riches en nucléotides C. Une organisation similaire est retrouvée au niveau du promoteur de gènes spécifiquement induits lors de la blessure. Les boîtes L, présentes dans le promoteur de la COMTII, pourraient intervenir dans ce genre d'interactions car ce sont des motifs riches en nucléotides C.

Les boîtes GT, représentées plusieurs fois dans les promoteurs, semblent jouer un rôle dans la modulation de l'expression de certains gènes végétaux, soit en tant qu'activateur ou en tant que répresseur.

10 **Exemple 3 : Analyse fonctionnelle des régions promotrices du gène COMTII**

L'analyse fonctionnelle du promoteur COMTII a été réalisée par transgénèse en expression stable. Le transgène a été obtenu par fusion transcriptionnelle entre le promoteur et un gène rapporteur, le gène GUS (β -glucuronidase). Quatre constructions correspondant à différentes délétions du promoteur ont été réalisées afin de préciser la nature des séquences promotrices importantes responsables de la régulation du gène. Ces constructions correspondent aux séquences promotrices de -1215 à +24 paires de bases (bp), de -420 à +24 bp, de -313 à +24bp et de -121 à +24 bp (par rapport au site +1 de la transcription), 557 à 1795, 1352 à 1795, 1459 à 1795 et 1651 à 1795 respectivement sur la SEQ ID NO 1 introduites en amont du gène GUS dans le vecteur pBi101 (Clontech).

Les différentes constructions ont été introduites via *Agrobacterium tumefaciens* dans le génome des plantes. Une population d'une dizaine de plants de tabac transformés a été régénérée pour chaque construction. Le niveau d'expression du transgène a été déterminé par dosage de l'activité enzymatique et par des tests histochimiques. Parallèlement l'expression des gènes COMTII a été analysée par mesure de l'activité des enzymes correspondantes.

Résultats:

L'activité GUS a été testée dans ces plantes dans différentes conditions d'induction des réactions de défense, par un éliciteur fongique injecté dans les feuilles (mégaspermine), ou après exposition aux UV. Les résultats obtenus sont rapportés dans les Tableaux 1 et 2 ci-dessous. L'activité GUS est exprimée en pmole MU/min. mg. Pour le Tableau 1, le témoin (T) est constitué par l'infiltration d'eau dans les feuilles des

plantes transformées. Des plantes contrôles transformées avec un vecteur vide avaient une activité d'environ 10-30 pmoles/min.mg. Pour le Tableau 2, le témoin (T) correspond à l'activité GUS basale dans les plantes non traitées.

Tableau 1 - Expression de l'activité GUS correspondant aux différentes constructions COMT II/GUS : induction par la mégaspermine

| Construction COMT II/GUS | Activité GUS | |
|--------------------------|--------------|--------------|
| | T | Mégaspermine |
| COMT II -1215 à +24 | 150 | 1150 |
| COMT II -420 à +24 | 2 | 6 |
| COMT II -313 à +24 | 0,4 | 0,8 |
| COMT II -121 à +24 | 0,2 | 0,8 |

Tableau 2 - Expression de l'activité GUS correspondant aux différentes constructions COMT II/GUS : induction aux UV

| Construction COMT II/GUS | Activité GUS | |
|--------------------------|--------------|-----|
| | T | UV |
| COMT II -1215 à +24 | 90 | 900 |
| COMT II -420 à +24 | 10 | 12 |
| COMT II -313 à +24 | 10 | 11 |
| COMT II -121 à +24 | 11 | 10 |

Ces résultats montrent que la taille du promoteur doit être supérieure à 600pb, en l'occurrence 1239 bp pour permettre l'induction et une forte expression du gène GUS. Les délétions du promoteurs correspondant aux constructions (-420 à +24), de (-313 à +24) et de (-121 à +24) provoquent une perte complète de l'expression du gène GUS dans toutes les conditions testées. L'activité du gène GUS sous le contrôle du promoteur de 1239 pb est 1000 fois supérieure à celle observée pour les autres constructions.

Activation du promoteur de la COMTII par la blessure et le méthyle jasmonate et par des éliciteurs d'origine et de nature variées.

Les plantes transgéniques possédant la construction COMTII(- 1215 à +24)/GUS ont été traitées avec différents produits chimiques, régulateurs des réactions de défense,

par l'acide salicylique (SA) et le méthyl-2-6-dichloroisonicotinique (INA), par des éliciteurs fongiques comme des glucanes ou des fragments de chitine et un éliciteur d'origine végétale comme la pectine. L'activité GUS a été mesurée dans les feuilles 16h après infiltration de ces composés et les résultats rapportés dans le Tableau 3 ci-dessous.

- 5 L'activité GUS est exprimée en pmole MU/min.mg. Le témoin (T) correspond à l'activité GUS basale dans les plantes transformées non traitées.

Tableau 3 - Induction de l'activité GUS par des éliciteurs

| | Activité GUS | Induction % |
|----------------------------|--------------|-------------|
| T | 600 | 100 |
| H2O | 1200 | 200 |
| SA (1mM) | 1200 | 200 |
| INA (1mM) | 1700 | 200 |
| Chitines (100µg/ml) | 1200 | 200 |
| Glucanes (200µg/ml) | 1400 | 200 |
| Pectines (200µg/ml) | 3700 | 600 |

- 10 L'augmentation la plus forte de l'activité GUS (de l'ordre de 3) est obtenue dans les plantes infiltrées par des fragments pectiques par rapport au contrôle.

- L'induction du promoteur de -1239 pb a été étudiée lors de la blessure ou après traitement par le méthyle jasmonate (molécule jouant un rôle dans la signalisation des réponses de défense lors de la blessure) et par le benzothiadiazole (BTH) (inducteur chimique de la SAR). L'activité GUS est mesuré 16h après traitement. Les résultats sont rapportés sur le Tableau 4 ci-dessous.

Tableau 4 - Induction de l'activité GUS par différents composés et stress

| | Induction de l'activité GUS % |
|--------------------------|-------------------------------|
| T | 100 |
| BTH | 250 |
| Blessure | 600 |
| Méthyle jasmonate | 1450 |
| UV | 1000 |

Le témoin (T) correspond à l'activité GUS des plantes non traitées. Le promoteur est activé par les différents traitements.

Les facteurs d'induction varient de 2,5 (BTH) à 14,5 (méthyle jasmonate).

Activation du promoteur de la COMTII lors de l'infection virale.

5 L'inoculation du VMT chez le tabac nécessite la production de micro blessures au niveau des feuilles permettant l'entrée du virus et sa multiplication. L'activité GUS et l'activité COMTII ont été mesurées dans les feuilles blessées et dans les feuilles inoculées par le virus. Les résultats (figure 1) montrent que le gène GUS sous le contrôle du promoteur COMTII a une cinétique d'induction identique à celle du gène
10 COMTII endogène, suivie par la mesure de l'activité catalytique des protéines correspondantes. Le promoteur COMTII est induit précocement par la blessure et présente un maximum d'activité à 16h. Le même pic d'activité est observé à 16h au cours de l'infection virale et est dû à la blessure des feuilles provoquée par l'inoculation du virus. Dans les feuilles inoculées, l'activité GUS est fortement stimulée à partir du
15 3ème jour et progresse jusqu'au 7ème jour. L'induction locale et systémique du promoteur lors de l'infection virale a été mesurée à 3 et 7 jours après l'inoculation du VMT. Les activités GUS exprimées en pmol MU/min.mg, sont rapportées dans le Tableau 5 et représentent une moyenne des valeurs obtenues dans 9 transformants. Le témoin T correspond à l'activité GUS des plantes non traitées.

20 **Tableau 5 - Induction locale et systémique (SAR) de l'activité GUS**

| | Activité GUS |
|---|--------------|
| T | 700 |
| Feuilles inoculées après 3 jours | 3800 |
| Feuilles inoculées après 7 jours | 7100 |
| Feuilles SAR après 7 jours | 2700 |

Ces résultats montrent une induction de 1100% du promoteur à 7 jours dans les feuilles inoculées. L'activité GUS mesurée à 7 jours dans les feuilles SAR est plus faible mais très significative. Cependant, dans les feuilles non inoculées les facteurs
25 d'induction calculés à partir des activités GUS sont plus fortes que celles obtenues à partir des activités COMTII (Tableau 6). Ceci est dû, d'une part au fait que le test d'activité GUS est plus sensible que celui de la COMTII et, d'autre part au fait que la

protéine GUS est extrêmement stable et que l'activité GUS mesurée correspond à une accumulation de cette protéine après le traitement. La comparaison des activités GUS et COMTII est rapportée dans le Tableau 6 ci-dessous. Les feuilles non inoculées où se développe la résistance systémique acquise sont appelées "feuilles SAR".

5 **Tableau 6 – Induction des activités GUS et COMTII 3 et 7 jours après inoculation par le VMT dans les feuilles infectées et les feuilles SAR**

| | Induction des activités GUS | | Induction des activités COMTII | |
|----------------|-----------------------------|--------------|--------------------------------|--------------|
| | Feuilles Inoculées | Feuilles SAR | Feuilles Inoculées | Feuilles SAR |
| 3 jours | 5,8 | - | 5,8 | - |
| 7 jours | 11 | 3,9 | 15 | 1,8 |

Analyse histochimique de l'activité GUS lors d'une infection virale et après blessure.

10 Une analyse histochimique de l'activité GUS dans des feuilles inoculées par le VMT, 7 jours après virose, montre que l'expression du gène GUS est localisée dans les cellules entourant le site d'infection. Des coupes transversales des feuilles au niveau des lésions ont été réalisées afin de déterminer les types cellulaires impliqués et, montrent que l'induction du gène GUS n'est pas tissu spécifique mais concerne toutes les cellules
15 autour des lésions.

L'analyse histochimique de l'expression du gène GUS dans des feuilles blessées, 2 jours après traitement, montre une induction du gène GUS dans les tissus non blessés entourant les sites de blessure par piqûres ou à l'aide de forceps. Ces résultats impliquent qu'un signal est émis à partir des tissus blessés vers les tissus intacts induisant une
20 expression systémique du gène GUS. Le méthyle jasmonate synthétisé dans les tissus blessés pourrait induire à distance le gène GUS, car une application exogène de méthyle jasmonate induit une activité GUS. Le test histochimique réalisé sur des feuilles issues de plantes transgéniques 35S/GUS est le contrôle positif de l'expérience. Des coupes transversales de feuilles blessées montrent également que tous les types cellulaires sont
25 induits par la blessure.

Matériel et méthodes

Criblage d'une banque génomique et identification du clone correspondant au gène exprimé pendant la réponse de défense.

Une banque d'ADN génomique de tabac (*Nicotiana tabacum* var. Xanthi) construite dans λ -EMBL3 (Clontech) a été criblée avec une sonde radioactive d'ADNc de COMT II (Pellegrini & al., 1993). Six clones génomiques positifs ont été isolés après quatre tours de purification. Ces clones purifiés ont été testés par PCR pour identifier celui qui comprend le gène COMT exprimé pendant la réponse d'hypersensibilité (HR) des feuilles de tabac au VMT. Les amorces 5' et 3' pour l'analyse PCR sont représentés par les oligonucléotides 1 et 2 ci-dessous (SEQ ID NO 4 et SEQ ID NO 5 respectivement) :

10 Oligo 1 : 5' CGTTTCGCAA TGTGATTTGA TC 3'

10 Oligo 2 : 5' CTCAAATGA CATCCTTTCA TAC 3'

Ils sont dérivés de la région non traduite en 3' de l'ADNc de COMT II. L'analyse PCR est effectuée à 62 °C (température de fusion théorique) de manière à promouvoir une hybridation spécifique. Un seul clone permet l'amplification du fragment attendu de 400 paires de bases comme le fait l'ADNc employé comme contrôle positif. Le clone génomique de COMT II a été purifié sur Quiagen tip selon le protocole décrit par le fabricant et sous cloné dans le site de restriction *Sall* du vecteur plasmide puc 18.

Séquençage de l'ADN.

Le séquençage de l'ADN a été effectué sur l'ADN double brin dénaturé selon la méthode de Sanger & al. (1977) en employant le kit "rhodamin dye terminator cycle ready" avec l'ADN polymérase FS ampliPac (Perkin-Elmer, P/N402078) et un séquenceur Applied Biosystems 373 (Perkin-Elmer). La séquence a été déterminée sur les deux brins avec des recouvrements en employant des amorces synthétisées à partir de séquences déjà déterminées.

Analyse des produits d'extension d'amorces.

25 La réaction d'extension des amorces a été effectuée sur l'ARN total selon la méthode décrite dans Current Protocols in Molecular Biology (Trienzenberg, 1992). L'ARN total isolé de feuilles de tabacs infectées par le VMT et de feuilles de tabacs non infectées (comme contrôle négatif) a été hybridé à l'oligonucléotide suivant (SEQ ID NO 6), complémentaire de l'ARNm du COMT II et marqué à l'extrémité 5' :

30 Oligo 3 : 5' CTGAAGATGT CAATAGTTGC ATGGC 3'

Le produit de l'extension a été séparé sur un gel de polyacrylamide à 6 %. La localisation du site d'initiation de la transcription a été déterminée sur la base de la

comigration des produits d'extension avec l'échelle de séquence de la obtenue à partir de la région correspondante du gène (Sänger & al., 1977).

C nstruction des plasmides.

Les versions tronquées du promoteur COMTII ont été amplifiées par PCR en
5 employant les amorces PAS1 en 3' et PS1, PS2, PS3 et PS4 en 5' représentés ci-après (SEQ ID NO 7 à 11 respectivement), conduisant respectivement à l'amplification des fragments nucléotidiques de longueurs suivantes : -1215/+24, -420/+24, -313/+24 et -121/+24 (numérotation relative au site d'initiation de la transcription).

PAS1 : 5' GGTCTAGAGG GCCTTTTAGA GTGTTTTTGT TAG 3'
10 PS1 : 5' AAAGTCGACC GTCCACCTGT GCCAACAAT 3'
PS2 : 5' TGTTTGGTGT TATGCTTCCG TCCT 3'
PS3 : 5' AAAAAGCTTT TTTAGGATGG AGTACAGCC 3'
PS4 : 5' TTTAAGCTTA AAGAGAACCA GACAATATT 3'

L'amplification a été effectuée pendant 30 cycles avec une étape initiale de 4
15 minutes à 95°C et une étape finale de 5 minutes à 72°C. Chaque cycle consiste en 1 minute à 95°C suivi d'1 minute d'étape d'hybridation puis 1 minute 30 à 72°C. L'étape d'hybridation est réalisée à 54°C, 59°C, 55°C et 50°C pour amplifier les fragments de longueurs -1215, -420, -313 et -121 paires de base respectivement. Le fragment de promoteur de 1215 paires de bases est digéré par *Sall* et *XbaI*, les sites correspondants
20 étant présents dans les amorces PS1 et PSA1 respectivement. Les fragments de promoteur de 420, 313 et 121 paires de bases sont digérés avec *HindIII* et *XbaI* (le site pour *HindIII* est présent dans les amorces PS2, PS3 et PS4, et le site *XbaI* dans l'amorce PAS1). Tous les fragments sont clonés dans le plasmide pBI101 (Quiagen) et digérés avec les enzymes appropriés pour créer une fusion transcriptionnelle avec le gène
25 rapporteur GUS. Tous les construits sont séquencés pour confirmer leur structure et les frontières de jonction.

Transformation des plantes

Les différents construits promoteur COMTII-GUS obtenus précédemment dans le plasmide pBI101 sont introduits dans une souche d'*Agrobacterium tumefaciens*
30 GV3101 (pPM6000) (Rossi & al., 1993) par électroporation (Nagel & al., 1990). Les plants de tabac (*Nicotiana tabacum* cv Samsun NN) sont transformé par infiltration d'*Agrobacterium* sur des plants de 10 jours (Rossi & al., 1993). Les plantes sont

régénérées sur un milieu Murashige & Skoog (MS) (GIBCO BRL) supplémenté avec du saccharose (30 g/l pour la formation des tiges et 15 g/l pour la formation des racines), de la 6-benzylaminopurine (Serva) (2 mg/ml), et de l'acide naphthalène acétique (Serva) (0,05 mg/ml). La kanamycine (150 mg/ml) est employée comme agent de sélection

5 durant les étapes de régénération *in vitro* et de propagation. Des plantes contrôles ont été préparées par transformation avec le vecteur vide pBI101. Sept à 10 transformants indépendants sont régénérés pour chaque construit. Les transformants primaires sont auto fécondés et les graines F1 sont germées sur un milieu MS comprenant 300 mg/l de kanamycine.

10 **Essais enzymatiques**

La localisation histochimique du GUS dans les plantes transgéniques est effectuée selon la méthode décrite par Jefferson & al. (1987). La réaction histochimique est incubée dans l'obscurité à 37°C pendant 12 heures. Les tissus sont rincés, d'abord avec un tampon phosphate 50 mM pour terminer la réaction, puis plusieurs fois avec de

15 l'éthanol de 70% à 90% pour éliminer la pigmentation des tissus. Après la réaction histochimique, les tissus sont rincés dans l'éthanol à 70% et sont inclus dans une historésine de fixation (Jung) pour des sections transversales de feuilles. Les blocs d'historésines sont coupés avec un microtome et des photographies sont prises à un grossissement de 10 fois par un microscope binoculaire.

20 Le dosage des activités COMTII et GUS a été effectué sur 100mg de tissus. Le tissu est homogénéisé dans un tampon phosphate de sodium 100mM à pH 7,5 et 10 mM de DTT après addition de polyclar AT (Serva) et de quartz. Les extraits bruts sont clarifiés par centrifugation et par filtration sur de la laine de verre. La mesure des activités GUS et COMTII est effectuée sur les mêmes extraits bruts. Pour la mesure de

25 l'activité COMTII, un aliquote de l'extrait protéique est ajouté à 1 ml de tampon phosphate comprenant 100µM de catéchol, 50µM de S-adénosyl-L-méthionine tritiée ($1,5 \cdot 10^5$ cpm/ml) et incubé pendant 3 heures à 37°C. La réaction est stoppée par addition de 100µl d'acide sulfurique 9M. Le produit radioactif de la réaction, l'acide ferulique, est extrait par 5 ml d'une solution NA de scintillation (Beckman) et la radioactivité est

30 comptée sur un appareil Beckman LS 9000. La mesure fluorimétrique de l'activité GUS est effectuée sur les mêmes échantillons selon la procédure de Jefferson & al. (1987). Le contenu protéique est déterminé par la méthode de Bradford (1976) en employant les

réactifs Biorad.

Plants de tabac.

Les plants de tabac transgéniques (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN) sont cultivés in vitro sous un cycle de lumière de 12h(24°C)/12(20°C) pendant 5 semaines après la germination. Ils sont propagés sur un milieu MS avec addition de kanamycine (150 mg/l) comme agent de sélection. Ils sont ensuite transférés en serre et cultivés en sol sous un cycle de lumière 16h/8h à 22°+2°C.

Traitement des plantes.

Traitement par un éliciteur : Des solutions sont infiltrées par un seringue équipée d'une aiguille fine dans le mésophyle des feuilles. Les zones infiltrées sont délimitées avec un marqueur "felt-tip". Les zones infiltrées sont récoltées 16 heures après le traitement. Les feuilles sont traitées avec une solution de β -mégaspermine, un éliciteur protéique purifié d'un milieu de culture de *Phytophthora megasperma* (Kauffmann & al., 1993), ou d'oligosaccharides comme les oligomères de chitine (100 μ g/ml), des fragments de glucane (200 μ g/ml), et des fragments pectiques (200 μ g/ml). Les plantes témoins sont infiltrées avec de l'eau.

Blessure : Des feuilles totalement développées sont blessées avec un hémostat ou percées avec des aiguilles. Les feuilles blessées sont ensuite récoltées 16 ou 24 heures après blessure pour les analyses fluorimétriques ou histochimiques.

Traitement UV : La partie supérieure de plantes transgéniques âgées de 5 semaines est exposée aux rayons UV ($\lambda=254$ nm) pendant 10 minutes puis les plantes sont placées dans l'obscurité jusqu'à la collecte des tissus 16 heures suivant le traitement.

Infection par le VMT : Des plantes transgéniques âgées de 10 semaines sont infectées par une suspension de VMT dans l'eau (0,2 μ g/ml) comprenant de la célite comme agent abrasif. Des lésions locales apparaissent environ 48 heures après l'inoculation. Les feuilles frottées avec une suspension aqueuse de célite sont employées comme témoin de blessure. Les feuilles sont récoltées à différentes périodes suivant l'infection puis congelées dans l'azote liquide.

Traitements chimiques : (1) Des solutions de SA (1mM) ou de INA (50 μ M) sont infiltrées dans les feuilles de tabac en employant le protocole décrit pour le traitement par des éliciteurs. (2) Sous des conditions de culture identiques, on pulvérise sur les

plantes transgéniques des solutions de SA (10mM), INA (1mM) ou BTH (50µM). Les
tissus sont recueillis 16 heures après traitement. Les plantes traitées avec de l'eau sont
utilisées comme témoin. (3) Des plantes âgées de sept semaines sont transférées dans
des boîtes transparentes et hermétiques et soumises à une atmosphère de 3,5µM de
5 MeJa (Serva). Les tissus sont prélevés à différents temps suivant le traitement. Les
plantes témoins sont placées dans les mêmes boîtes sans MeJa.

Références :

- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A.,
10 Struhl, K. (1998) *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons.
- Bradford M.M. (1976). *A rapide and sensitive method for the quantitation of microgram
quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding*, Anal. Biochem. 72,
248-254.
- Jefferson R.A., Kavanagh T.A. & Bevan M.W. (1987). *GUS fusions : β -glucuronidase
15 as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants*. EMBO J. 6, 3901-3907.
- Kauffmann S., Baillieul F., Genetet I., Kopp M. & Fritig B. (1993). *Two proteins
secreted by Phytophthora megasperma elicit and defense-related responses in tobacco*.
In Mechanisms of plant defense responses, B. Fritig and M. Legrand, Dordrecht :
Kluwer Academic Publishers, 140-143.
- 20 Nagel R., Elliott A., Masel A., Birch R.G. & Manners J.M. (1990). *Electroporation of
binary Ti plasmid vector into Agrobacterium tumefaciens and Agrobacterium
rhizogenes*. FEMS Microbiol. Lett. 67, 325-328.
- Pellegrini L., Geoffroy P., Fritig B. & Legrand M. (1993). *Molecular cloning and
expression of a new class of ortho-diphenol-O-methyltransferases induced in tobacco
25 (Nicotiana tabacum L.) leaves by infection or elicitor treatment*. Plant Physiol. 103,
509-517.
- Rossi L., Escudero J., Hohn B. & Tinland B. (1993). *Efficient and sensitive assay for T-
DNA dependant transient gene expression*. Plant Mol. Biol. Rep. 12, 220-229.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory
30 manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sänger F., Nicklens S. & Coulson A.R. (1977). *DNA sequencing with chain-terminating
inhibitors*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74, 5463-5467.



Trienzberg S.J. (1992). *Primer extension*. In Current Protocols in Molecular Biology.
J. Wiley & Sons eds. 20.4.8.1

Revendications

1. Fragment d'acide nucléique isolé comprenant un promoteur de plante inductible, caractérisé en ce que ledit promoteur est constitué par le promoteur d'un gène d'*O*-méthyltransférase de classe II (COMT II) de plante.
- 5 2. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est constitué par un promoteur de COMT II de plante.
3. Fragment d'acide nucléique selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que le promoteur est activé par les blessures, les infections virales, les agressions aux rayons UV, les agressions chimiques, ou les agressions par pathogène,
10 un insecte ou un nématode
4. Fragment d'acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la COMTII de plante est une COMT de plante qui n'est pas exprimée dans les plantes saines non traitées, mais qui est exprimée à la suite d'une agression mécanique, chimique, ou par un pathogène, un insecte ou un nématode.
- 15 5. Fragment d'acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la plante est une plante monocotylédone ou dicotylédone, en particulier choisie parmi le riz, le blé, l'orge, le tournesol, le maïs, le tabac, le colza, le soja ou *Arabidopsis thaliana*.
6. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 5, caractérisé en ce
20 que la plante est une plante dicotylédone, de préférence le tabac.
7. Fragment d'acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le promoteur comprend une séquence en 5' du site d'initiation de la traduction ou codon " start " (ATG) de la séquence codante de la COMTII permettant la transcription et l'expression de ladite séquence codante.
- 25 8. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 1 à 7, caractérisé en ce que le promoteur comprend une séquence de plus de 600 nucléotides en amont de l'ATG de la COMTII, de préférence de plus de 1000 nucléotides en amont de l'ATG, plus préférentiellement de plus de 1200 nucléotides en amont de l'ATG.
9. Fragment d'acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 8,
30 caractérisé en ce que le promoteur comprend un site d'initiation de la transcription situé à moins de 100 nucléotides en amont de l'ATG, avantageusement à environ 90 nucléotides en amont.

10. Fragment d'acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que l'extrémité 3' du promoteur est située entre le site d'initiation de la transcription et l'ATG.

11. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 10, caractérisé en ce que l'extrémité 3' du promoteur est située entre 10 et 50 nucléotides en aval du site d'initiation de la transcription, plus préférentiellement entre 20 et 40 nucléotides en aval, encore plus préférentiellement entre 20 et 30 nucléotides en aval.

12. Fragment d'acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce qu'il est constitué par le promoteur COMTII de tabac défini par la séquence nucléotidique en amont de l'ATG représentée par l'identificateur de séquence 1 (SEQ ID NO 1) et les séquences homologues.

13. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 12, caractérisé en ce qu'il est constitué, par la séquence comprise entre les nucléotides 557 et 1796 de l'identificateur de séquence n° 1

14. Gène chimère (ou cassette d'expression) fonctionnel dans les cellules végétales et les plantes comprenant dans le sens de la transcription une séquence de régulation en 5', une séquence codante et une séquence de régulation en 3', caractérisé en ce que la séquence de régulation en 5' comprend le fragment d'acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 13.

15. Gène chimère selon la revendication 14, caractérisé en ce que la séquence codante comprend une séquence codante pour un gène rapporteur ou une séquence codante pour une protéine d'intérêt.

16. Gène chimère selon la revendication 15, caractérisé en ce que la protéine d'intérêt est une protéine conférant aux plantes des propriétés de résistance aux maladies ou aux insectes.

17. Vecteur de clonage et/ou d'expression pour la transformation des cellules végétales ou des plantes, caractérisé en ce qu'il contient au moins un gène chimère selon les revendications 14 à 16.

18. Procédé de transformation des cellules végétales, caractérisé en ce qu'il consiste à intégrer au génome des dites cellules végétales au moins un gène chimère selon l'une des revendications 14 à 16.

19. Cellules végétales transformées caractérisées en ce qu'elles comprennent

un gène chimère selon l'une des revendications 14 à 16.

20. Plantes transformées caractérisées en ce qu'elles comprennent un gène chimère selon les revendications 14 à 16.

21. Plantes, caractérisées en ce qu'elles contiennent des cellules transformées
5 selon la revendication 19 ou obtenues par le procédé selon la revendication 18.

22. Plantes selon la revendication 21, caractérisées en ce qu'elles sont régénérées à partir des cellules transformées selon la revendication 19 ou obtenues par le procédé selon la revendication 18.

23. Plantes issues de la culture et/ou du croisement des plantes régénérées
10 selon la revendication 22.

24. Plantes selon l'une des revendications 20 à 23, caractérisées en ce qu'elles sont du type monocotylédones, en particulier les céréales, la canne à sucre, le riz et le maïs, ou dicotylédones, en particulier le tabac, la soja, le colza, le coton, le tournesol, la betterave, le trèfle.

15 25. Graines des plantes selon l'une des revendications 20 à 24.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES:

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: RHOBIO
- (B) RUE: 14-20 Rue Pierre BAIZET
- (C) VILLE: LYON
- (E) PAYS: France
- (F) CODE POSTAL: 69009

(ii) TITRE DE L'INVENTION: Promoteur inductible COMTII, gène chimère le comprenant et plantes transformées

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 3

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D'EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 1863 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: misc_signal
- (B) EMPLACEMENT: 667..672
- (D) AUTRES INFORMATIONS: /function= "boite W inverse"

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: misc_signal
- (B) EMPLACEMENT: 820..830
- (D) AUTRES INFORMATIONS: /function= "boite L inverse"

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: enhancer
- (B) EMPLACEMENT: 845..852

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: misc_signal
- (B) EMPLACEMENT: 1034..1047
- (D) AUTRES INFORMATIONS: /function= "boite P"

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: misc_signal
- (B) EMPLACEMENT: 1221..1226
- (D) AUTRES INFORMATIONS: /function= "boite G"

(ix) CARACTERISTIQUE:
 (A) NOM/CLE: misc_signal
 (B) EMPLACEMENT:1343..1356
 (D) AUTRES INFORMATIONS:/function= "boite L inverse"

(ix) CARACTERISTIQUE:
 (A) NOM/CLE: misc_signal
 (B) EMPLACEMENT:1369..1374
 (D) AUTRES INFORMATIONS:/function= "boite A"

(ix) CARACTERISTIQUE:
 (A) NOM/CLE: misc_signal
 (B) EMPLACEMENT:1377..1382
 (D) AUTRES INFORMATIONS:/function= "boite GT"

(ix) CARACTERISTIQUE:
 (A) NOM/CLE: misc_signal
 (B) EMPLACEMENT:1483..1488
 (D) AUTRES INFORMATIONS:/function= "boite GT"

(ix) CARACTERISTIQUE:
 (A) NOM/CLE: misc_signal
 (B) EMPLACEMENT:1562..1567
 (D) AUTRES INFORMATIONS:/function= "boite W inverse"

(ix) CARACTERISTIQUE:
 (A) NOM/CLE: misc_signal
 (B) EMPLACEMENT:1600..1614
 (D) AUTRES INFORMATIONS:/function= "boite L"

(ix) CARACTERISTIQUE:
 (A) NOM/CLE: CAAT_signal
 (B) EMPLACEMENT:1675..1679

(ix) CARACTERISTIQUE:
 (A) NOM/CLE: misc_signal
 (B) EMPLACEMENT:1681..1690
 (D) AUTRES INFORMATIONS:/function= "boite E"

(ix) CARACTERISTIQUE:
 (A) NOM/CLE: CAAT_signal
 (B) EMPLACEMENT:1695..1699

(ix) CARACTERISTIQUE:
 (A) NOM/CLE: TATA_signal
 (B) EMPLACEMENT:1735..1739

(ix) CARACTERISTIQUE:
 (A) NOM/CLE: rep_origin
 (B) EMPLACEMENT:1772

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

AAAGTTAGGG ACAATCTATA GTGTCACAAA GTTGCTTATG GCTTTTGGTT CAGATAAAGA 60

AAAAGAACAG CATTTTAATT TGTGAAGATT AGTCTGAGCA GAATTCATT GTATCTAGAA 120

| | | | | | | |
|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------|
| AGAAATTGAA | AAAAGAAATA | TTCTATTTCA | CTATTATGTT | AGGTGCAACT | ATATCATCAC | 180 |
| CATGGAAAAG | CCGGAGTAAA | AAGAGAACGT | AGAGGAGATT | TCATGATTTG | ATTGAGAATA | 240 |
| TAATATATTA | TTTTTTTGTA | ATTCCACACA | AAGATTAAAG | AAATGATCTG | ATCAATGATG | 300 |
| GCTCCGAGGA | TTTGGCTGTC | GCGGGAAC | TGACATTAAT | ATAAATTTGT | CGCTGCCTAT | 360 |
| AAAGACCCTA | TCTATCTATC | TATCTATCTA | TATATATATA | TATATATATA | TATATATATA | 420 |
| TATATATATA | TATATATATA | TATATATATA | TATATATAAG | CGCTAATATT | TGATTATTTT | 480 |
| TTAAAAATAT | TTATAAGTAT | ATATGAAATT | TTTGACGAAA | TTTTTGTTGT | ACCGTGACCC | 540 |
| CTCAACCTAT | AGTGTGCGTC | CACCTGTGCC | AACAATATAG | AGACAATTTG | CTCGTATAGT | 600 |
| CAGAAAGAGT | GTTTTACTTT | TTAGTTGCTT | TTTAGTGAAT | CTACTCGGTA | TAAAGTTAAA | 660 |
| TTAGTGGGTC | AATAAGTCGG | GTGAATAGTT | AAAGAAAACA | GTGGTGAGTT | TAGCTGTCAA | 720 |
| ATAATTTCTT | CTTTTTCTTG | TTTTACATT | AGAAATCAAA | ATAAAACACA | AGCTTTTTTG | 780 |
| ATTTATTTTA | ACACAAGCTA | ATTATATGTT | TATATGCTGG | TTAGGTGAAG | TAAAGCATGT | 840 |
| TATATGAGGA | AAGTACGAAG | AAAATGTGCC | AATTGTCGTG | TACAGCAAAG | CAGCCAGCAC | 900 |
| AAGCAAATTC | GCACCTTGATA | AGTGGCTAAG | TCCACTTTCT | AGTGGACCTA | GTGGTTCACT | 960 |
| AACTTTTACC | AAAAAGGCAA | TAATTTGCAA | TTCAAAAAGA | AAAAAGGAAA | AAAGAAACT | 1020 |
| AGACAGACTT | TAACACACCA | ACTCCCACAG | GAAGCAACAA | TGCAACTCAC | AAAAGGAAAC | 1080 |
| CGAGTTTTTC | CGCGACGGAT | CTAGAATTTG | GGTTCATTCT | TTACGCTTTT | TCGTATTAAA | 1140 |
| CTCATTATAT | TTGTATAATT | ATGGGTTTAT | ATTTTTTATT | TATTGTAATT | TTTGTAATAA | 1200 |
| TTTATATATA | AGTGTATACT | CCACGTCTCC | GGATACTACA | TTAGCCTCTA | GGGTTCTTAA | 1260 |
| TACTCTTGTT | AAATTGTCCA | GGCTCCAAAC | GCATGTTTCG | TTCAATTTTA | ACGGATGTTT | 1320 |
| CCGAACAAC | CCAAATGTTT | AATGTTAGGT | GTGTTTGGTG | TTAAGCTTCC | GTCCTAGGTT | 1380 |
| AATAGAATAG | ATAATTGTTG | TTTCTTATAT | AGTTTTGAAC | AATCGTCGCC | ATAAACTAAT | 1440 |
| TTTTAGGATG | GAAGCTAATT | TTTAGGATGG | AGTACAGCCT | AAGGTAAAAA | TATAACTATA | 1500 |
| AAAAATATCC | ATAAAAGGTG | AAATTTAATT | AGTAACATGA | AAAGATAAAA | CTAGTGTTAT | 1560 |
| CGGTCAAAC | TTCAAAAGAG | AAAGAAATAA | CTAGACAAAC | TTCAACAACC | AACCTGCCCA | 1620 |
| ACATGCTACT | GTGCAATTGA | AAAATAAACA | AAAGAGAACC | AGACAATATT | TCAACCAATA | 1680 |
| TTCCATCAAG | AAAACCAATT | ATGACAATTC | TTAACCAAAG | TCACAACATA | CACCTTATAA | 1740 |
| AAGCACTAAC | TCAACTGTAC | ATGATTGTGA | AGCCTAACAA | AAACACTCTA | AAAGGAAAAG | 1800 |
| ACTACGAGAA | TAATTACACT | ACAACCTCTA | TAGCTAATTC | TTGTCTCAAG | ATTTTCAGCT | 1860 |

ATG

1863

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 5371 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: double
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

- (ix) CARACTERISTIQUE:
 - (A) NOM/CLE: promoteur
 - (B) EMPLACEMENT:1..1860

- (ix) CARACTERISTIQUE:
 - (A) NOM/CLE: rep_origine
 - (B) EMPLACEMENT:1772

- (ix) CARACTERISTIQUE:
 - (A) NOM/CLE: exon
 - (B) EMPLACEMENT:1861..2281

- (ix) CARACTERISTIQUE:
 - (A) NOM/CLE: intron
 - (B) EMPLACEMENT:2282..3633

- (ix) CARACTERISTIQUE:
 - (A) NOM/CLE: exon
 - (B) EMPLACEMENT:3634..3944

- (ix) CARACTERISTIQUE:
 - (A) NOM/CLE: intron
 - (B) EMPLACEMENT:3945..4726

- (ix) CARACTERISTIQUE:
 - (A) NOM/CLE: exon
 - (B) EMPLACEMENT:4727..5089

- (ix) CARACTERISTIQUE:
 - (A) NOM/CLE: terminateur
 - (B) EMPLACEMENT:5090..5371

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

| | |
|--|-----|
| AAAGTTAGGG ACAATCTATA GTGTCACAAA GTTGCTTATG GCTTTTGGTT CAGATAAAGA | 60 |
| AAAAGAACAG CATTTTAATT TGTGAAGATT AGTCTGAGCA GAATTTTCATT GTATCTAGAA | 120 |
| AGAAATTGAA AAAAGAAATA TTCTATTTCA CTATTATGTT AGGTGCAACT ATATCATCAC | 180 |
| CATGGAAAAG CCGGAGTAAA AAGAGAACGT AGAGGAGATT TCATGATTTG ATTGAGAATA | 240 |
| TAATATATTA TTTTTTTGTA ATTCCACACA AAGATTAAGA AAATGATCTG ATCAATGATG | 300 |

| | | | | | | |
|-------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|------|
| GCTCCGAGGA | TTTGGCTGTC | GCGGGAACTA | TGACATTAAT | ATAAATTTGT | CGCTGCCTAT | 360 |
| AAAGACCCTA | TCTATCTATC | TATCTATCTA | TATATATATA | TATATATATA | TATATATATA | 420 |
| TATATATATA | TATATATATA | TATATATATA | TATATATAAG | CGCTAATATT | TGATTATTTT | 480 |
| TTAAAAATAT | TTATAAGTAT | ATATGAAATT | TTTGACGAAA | TTTTTGTGTG | ACCGTGACCC | 540 |
| CTCAACCTAT | AGTGTGCGTC | CACCTGTGCC | AACAATATAG | AGACAATTTG | CTCGTATAGT | 600 |
| CAGAAAAGAGT | GTTTTACTTT | TTAGTTGCTT | TTTAGTGAAT | CTACTCGGTA | TAAAGTTAAA | 660 |
| TTAGTGGGTC | AATAAGTCGG | GTGAATAGTT | AAAGAAAACA | GTGGTGAGTT | TAGCTGTCAA | 720 |
| ATAATTTCTT | CTTTTTCTTG | TTTTCACATT | AGAAATCAAA | ATAAAACACA | AGCTTTTTGT | 780 |
| ATTTATTTTA | ACACAAGCTA | ATTATATGTT | TATATGCTGG | TTAGGTGAAG | TAAAGCATGT | 840 |
| TATATGAGGA | AAGTACGAAG | AAAATGTGCC | AATTGTCGTG | TACAGCAAAG | CAGCCAGCAC | 900 |
| AAGCAAATTC | GCACTTGATA | AGTGGCTAAG | TCCACTTTCT | AGTGGACCTA | GTGGTTCACT | 960 |
| AACTTTTACC | AAAAAGGCAA | TAATTTGCAA | TTCAAAAAGA | AAAAAGGAAA | AAAGAAAAC | 1020 |
| AGACAGACTT | TAACACACCA | ACTCCCACAG | GAAGCAACAA | TGCAACTCAC | AAAAGGAAAC | 1080 |
| CGAGTTTTTC | CGCGACGGAT | CTAGAATTTG | GGTTCATTCT | TTACGCTTTT | TCGTATTAAA | 1140 |
| CTCATTATAT | TTGTATAATT | ATGGGTTTAT | ATTTTTTATT | TATTGTAATT | TTTGTAATAAT | 1200 |
| TTTATATATA | AGTGTATACT | CCACGTCTCC | GGATACTACA | TTAGCCTCTA | GGGTCTTAA | 1260 |
| TACTCTTGTT | AAATTGTCCA | GGCTCCAAAC | GCATGTTTCGT | TTCAATTTTA | ACGGATGTTT | 1320 |
| CCGAACAAC | CCAAATGTTT | AATGTTAGGT | GTGTTTGGTG | TTAAGCTTCC | GTCCTAGGTT | 1380 |
| AATAGAATAG | ATAATTGTTG | TTTCTTATAT | AGTTTTGAAC | AATCGTCGCC | ATAAACTAAT | 1440 |
| TTTTAGGATG | GAAGCTAATT | TTTAGGATGG | AGTACAGCCT | AAGGTTAAAA | TATAACTATA | 1500 |
| AAAAATATCC | ATAAAAGGTG | AAATTTAATT | AGTAACATGA | AAAGATAAAA | CTAGTGTTAT | 1560 |
| CGGTCAAAC | TTCAAAGAG | AAAGAAATAA | CTAGACAAAC | TTCAACAACC | AACCTGCCCA | 1620 |
| ACATGCTACT | GTGCAATTGA | AAAATAAACA | AAAGAGAACC | AGACAATATT | TCAACCAATA | 1680 |
| TTCCATCAAG | AAAACCAATT | ATGACAATTC | TTAACCAAAG | TCACAACTAA | CACTTATAAA | 1740 |
| AAGCACTAAC | TCAACTGTAC | ATGATTGTGA | AGCCTAACAA | AAACACTCTA | AAAGGAAAAG | 1800 |
| ACTACGAGAA | TAATTACACT | ACAACTCTTA | TAGCTAATTC | TTGTCTCAAG | ATTTTCAGCT | 1860 |
| ATGGAATCCT | CAACCAAAAG | CCAAATACCA | ACACAATCAG | AAGAAGAGCG | TAACTGCACA | 1920 |
| TATGCCATGC | AACTATTGTC | ATCTTCAGTC | CTCCCCTTTG | TGTTGCATTTC | AACAATTCAA | 1980 |
| TTGGAAGTTT | TTGAGATATT | AGCCAAATCT | AATGACACTA | AACTTTCTGC | TTCTCAAATT | 2040 |

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------|
| GTTTCTCAAA | TTCCTAACTG | CACAAAACCT | GAAGCACCTA | CTATGTTAAA | TAGGATGCTT | 2100 |
| TATGTCTTGG | CTAGTTACTC | CTTGTTTACT | TGTTCCATTG | TTGAAGATGA | AAAAAATAAT | 2160 |
| GGGGGCCAAA | AAAGAGTGTA | TGGTTTGTC | CAAGTGGGAA | AATTCCTTGT | TAAAAATGAA | 2220 |
| AATGGTGCA | CAATGGGGCC | ACTTTTGGCT | TTGCTTCAAA | ATAAAGTATT | CATAAACAGC | 2280 |
| TGGTAAGTTT | TGTCCTACTG | TGTATTCTTT | TTGCAGTGGC | TGTATTGATT | GGTTGCCTTT | 2340 |
| TTCACAAGAC | AAGATTCTTA | AGTTTTATTA | CTTGTCGATT | TATGTTAGTC | GTATGTGCTA | 2400 |
| GTGTTATTAT | TCTCCATCTG | ATCCTTTTAT | TGGTCACTTT | ACCTAAAAAT | ATTGTTACAA | 2460 |
| AACATTTGTC | CTTCTAGAAA | ATCAGGTATT | ATTAATTTTT | CAATTCCATC | TTTATTACTC | 2520 |
| CAATAGTGAA | TATGGTTATT | AATTAGTGTT | TTAAGGAAGA | TGTAAGGATA | ATTTAATCAA | 2580 |
| ATAGGATTTA | TTATTAATGT | TGTCAAAGAT | TCTGGTGGAT | GGATCGGAGA | AAATTTCTTC | 2640 |
| ATCTTAATCA | GAGTTTGATG | TTCGAGCCAC | AGGAATGAAT | TTGTTTTTAA | TAGGGAGTAT | 2700 |
| TTTCTCTTTG | AATAGACCTT | ACACAATAAA | AGGACAACCC | GGTACACTAA | GCTTCCGTTA | 2760 |
| TGCGCGGGGT | TCGGGGAAAG | GACCGCATCA | CCAGGTCTAT | TGTACGCAGC | GTTACCCAAC | 2820 |
| GTGAATCTAA | ATTAATGAGA | CTAAAAAATG | GAACCCAACA | CCAGTGAAAA | CCAAAAAAG | 2880 |
| AAGCAAACCT | TAGTGGATGG | CTTGGAAGA | TCTTTCTTCT | TGAATAACTT | GGAGCGCTAT | 2940 |
| ATATTAAGGC | GTCGCAGCCG | TTAGATACTT | TCAAGAAGAA | AGCTAAAAAA | TGTTTTAAAG | 3000 |
| TTACGGCGCT | AGAATAATGA | AATTTCTCTA | TATATATAAT | TCAAAAGTTA | ATAATTTATT | 3060 |
| CTCTTAACCT | AAATCTATAT | TATAAACTA | TATTAAGTAA | CTTCTGCCTA | ATTTATAATA | 3120 |
| TACAACTAAT | GTTTTGAGAA | AACAAAATAA | CAACAACATC | AAACCCAATG | AAATCCCACA | 3180 |
| AGTAGAGTTT | GGGGAGGATA | GTGTGTACGG | AGACCTTACC | CCTACCTTAT | AAAGTTAAAG | 3240 |
| AGGCTGTTTT | CGAAAGACTC | TCGGCTCAAG | AACATTAAAA | ATTTGAGAAA | ACAAAATATA | 3300 |
| AATTCAAAAC | CTATATTAAG | TTTATAATCC | ATGGTATATT | ATATTGGCTT | AGTAATCTGA | 3360 |
| AATGAAAGAT | TTATGTTTGA | CTCCTCTAAA | CTTGTTTTTA | ATGCAAAAGA | GGCACAACAT | 3420 |
| ATATATTATA | AGTATCTTTT | TTTGGTTTCC | CACTGTGGCC | GCTAAATTCG | GATTCGCTGG | 3480 |
| AAGTGTCA | TTGTTGGAGA | TGGGGGCAAC | GCTCACAACA | AAGACGATTC | TATAATTAGT | 3540 |
| GTTCGAACCT | GAAATTTTAG | TTAAAGATAA | AGAAGTACTT | ACCATAATGG | TAGATATGAT | 3600 |
| CATATCTGAC | TCTCTTTCTA | ATTTCAAATT | ACAGGTTTGA | ACTAAAAGAT | GCAGTTCTTG | 3660 |
| AAGGAGGAGT | TCCATTTGAC | AGGGTACACG | GTGTGCATGC | ATTTGAATAT | CCAAAATCGG | 3720 |
| ACCCAAAATT | CAATGATGTT | TTCAACAAGG | CAATGATCAA | TCACACAAC | GTAGTCATGA | 3780 |

| | | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|------|
| AAAAAATACT | TGAAAATTAC | AAAGGTTTTG | AGAACCTTAA | AACTTTGGTT | GATGTTGGAG | 3840 |
| GTGGTCTTGG | AGTTAACCTC | AAGATGATTA | CATCTAAATA | CCCCACAATT | AAGGGCACTA | 3900 |
| ATTTTGATTT | GCCACATGTT | GTTCAACATG | CCCCTTCCTA | TCCTGGTACC | TTCTCTCGTT | 3960 |
| CTTATTTTGT | TGTTTATTAT | ATTTACTTCG | ATCATCAGGT | CTAGGTCTGT | CAAGTTAAAT | 4020 |
| TCGTTCTCAA | AAAAGTTTAT | AAAGGTTTTG | AACTCCATCA | CCTATTGCTT | TAGGATTTTG | 4080 |
| AGTTGTATGC | TCTGAGTCTT | GCGCATGGTA | TCATAGTCAA | TTTATTTAAG | CTCGTTATTG | 4140 |
| CACTTG TGAA | TTCTATTATA | TAAGGAGTAA | GCCTACCAAA | AAGGAGCGAA | AATATTTTCC | 4200 |
| AAAAC TCTTT | TTAAACCTTC | CTCACCCCAT | TCCCCTCTCC | CCTCTCCCCC | AACACCACCC | 4260 |
| ACCACCCCAA | CTCCCCCGTC | TTAGTTTTTT | TATTTATCCT | GGACTTTCTT | ATATTTTATG | 4320 |
| CTTTCCTTTA | ATTGAACTCT | TGTAAC TAA | CCATTTGCCC | CCCACCCTAT | AGTGT TTGCC | 4380 |
| TAAATTTTAT | ATTTTTCAAA | ATAATATTTT | CTATTTACTA | ATTAAACATT | AGAAAATATT | 4440 |
| TTTCGGATTT | TTTTCCACTC | ACCAACCAAG | CATGGGAAAA | TAGTGATAAA | ACTACTCATT | 4500 |
| TTTCAAATA | ATATTTTCAA | GGAAAACATT | TTCTTTTATA | CCAAATACCC | TTACTCTTGT | 4560 |
| ATACAAATCT | TCATGTCGAT | GATCTTGCAA | TATATATACA | TGTATATGTA | TGATTTGATA | 4620 |
| AACCACATGA | ACAAAATGGT | TGAGCTCTGC | GAATTGTGAT | ATATGATTTG | CTTATGTGTT | 4680 |
| GTGCACTATC | AATTACTTAA | ATTAAACTTC | ATCTAATAAT | ATTGCAGGGG | TGGAACATGT | 4740 |
| TGGGGGAGAT | ATGTTTGAAA | GTGTTCCAGA | AGGAGATGCT | ATTTT TATGA | AGTGGATTCT | 4800 |
| TCATGACTGG | AGTGATAGTC | ACAACCTCAA | GTTGCTAAAG | AACTGCTACA | AGGCTCTACC | 4860 |
| AGACAATGGA | AAGGTGATTG | TTGTTGAGGC | CATTTTACCA | GTGAAACCAG | ACATTGACAC | 4920 |
| CGCAGTGGTT | GGCGTTTCGC | AATGTGATTT | GATCATGATG | GCTCAAAATC | CTGGAGGCAA | 4980 |
| AGAGCGATCG | GAAGAGGAGT | TTCGAGCCTT | GGCTACTGAA | GCTGGATTCA | AAGGCGTTAA | 5040 |
| CTTAATATGT | TGTGTCTGTA | ATTTT TGGGT | CATGGAATTC | TGCAAGTAGA | TTTCTACTGT | 5100 |
| ACATTGAGTT | TCTACTACTC | TTGAGTATCC | ATTTATGGCA | ATCTGGGACT | GGAATTGCAG | 5160 |
| CTTAGTCCAG | ATTGAACATT | GATATTCCTA | ATAATATTTT | TATTATTTCC | CTTGTTTATT | 5220 |
| TCTCTTGAT | GAAAGGATGT | CATTTTGAGT | ATTGATAATC | ATGTTCTCTA | GGACAGAAAT | 5280 |
| TGTAAC TTTG | TCCAAC TTTA | TTGATATTCC | TAGTAAGATT | TATATGACAT | GTGTCTCTGG | 5340 |
| TTTGAGAAGA | GTTTCAATAT | CTACAGACGG | G | | | 5371 |

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 1095 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
 (B) EMBLACEMENT: 1..1095

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

| | |
|---|-----|
| ATG GAA TCC TCA ACC AAA AGC CAA ATA CCA ACA CAA TCA GAA GAA GAG | 48 |
| Met Glu Ser Ser Thr Lys Ser Gln Ile Pro Thr Gln Ser Glu Glu Glu | |
| 1 5 10 15 | |
| CGT AAC TGC ACA TAT GCC ATG CAA CTA TTG TCA TCT TCA GTC CTC CCC | 96 |
| Arg Asn Cys Thr Tyr Ala Met Gln Leu Leu Ser Ser Ser Val Leu Pro | |
| 20 25 30 | |
| TTT GTG TTG CAT TCA ACA ATT CAA TTG GAA GTT TTT GAG ATA TTA GCC | 144 |
| Phe Val Leu His Ser Thr Ile Gln Leu Glu Val Phe Glu Ile Leu Ala | |
| 35 40 45 | |
| AAA TCT AAT GAC ACT AAA CTT TCT GCT TCT CAA ATT GTT TCT CAA ATT | 192 |
| Lys Ser Asn Asp Thr Lys Leu Ser Ala Ser Gln Ile Val Ser Gln Ile | |
| 50 55 60 | |
| CCT AAC TGC ACA AAA CCT GAA GCA CCT ACT ATG TTA AAT AGG ATG CTT | 240 |
| Pro Asn Cys Thr Lys Pro Glu Ala Pro Thr Met Leu Asn Arg Met Leu | |
| 65 70 75 80 | |
| TAT GTC TTG GCT AGT TAC TCC TTG TTT ACT TGT TCC ATT GTT GAA GAT | 288 |
| Tyr Val Leu Ala Ser Tyr Ser Leu Phe Thr Cys Ser Ile Val Glu Asp | |
| 85 90 95 | |
| GAA AAA AAT AAT GGG GGC CAA AAA AGA GTG TAT GGT TTG TCA CAA GTG | 336 |
| Glu Lys Asn Asn Gly Gly Gln Lys Arg Val Tyr Gly Leu Ser Gln Val | |
| 100 105 110 | |
| GGA AAA TTC TTT GTT AAA AAT GAA AAT GGT GCA TCA ATG GGG CCA CTT | 384 |
| Gly Lys Phe Phe Val Lys Asn Glu Asn Gly Ala Ser Met Gly Pro Leu | |
| 115 120 125 | |
| TTG GCT TTG CTT CAA AAT AAA GTA TTC ATA AAC AGC TGG TTT GAA CTA | 432 |
| Leu Ala Leu Leu Gln Asn Lys Val Phe Ile Asn Ser Trp Phe Glu Leu | |
| 130 135 140 | |
| AAA GAT GCA GTT CTT GAA GGA GGA GTT CCA TTT GAC AGG GTA CAC GGT | 480 |
| Lys Asp Ala Val Leu Glu Gly Gly Val Pro Phe Asp Arg Val His Gly | |
| 145 150 155 160 | |
| GTG CAT GCA TTT GAA TAT CCA AAA TCG GAC CCA AAA TTC AAT GAT GTT | 528 |
| Val His Ala Phe Glu Tyr Pro Lys Ser Asp Pro Lys Phe Asn Asp Val | |
| 165 170 175 | |
| TTC AAC AAG GCA ATG ATC AAT CAC ACA ACT GTA GTC ATG AAA AAA ATA | 576 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|--|
| Phe | Asn | Lys | Ala | Met | Ile | Asn | His | Thr | Thr | Val | Val | Met | Lys | Lys | Ile | | |
| | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | | | |
| CTT | GAA | AAT | TAC | AAA | GGT | TTT | GAG | AAC | CTT | AAA | ACT | TTG | GTT | GAT | GTT | 624 | |
| Leu | Glu | Asn | Tyr | Lys | Gly | Phe | Glu | Asn | Leu | Lys | Thr | Leu | Val | Asp | Val | | |
| | | | 195 | | | | 200 | | | | 205 | | | | | | |
| GGA | GGT | GGT | CTT | GGA | GTT | AAC | CTC | AAG | ATG | ATT | ACA | TCT | AAA | TAC | CCC | 672 | |
| Gly | Gly | Gly | Leu | Gly | Val | Asn | Leu | Lys | Met | Ile | Thr | Ser | Lys | Tyr | Pro | | |
| | | | 210 | | | 215 | | | | 220 | | | | | | | |
| ACA | ATT | AAG | GGC | ACT | AAT | TTT | GAT | TTG | CCA | CAT | GTT | GTT | CAA | CAT | GCC | 720 | |
| Thr | Ile | Lys | Gly | Thr | Asn | Phe | Asp | Leu | Pro | His | Val | Val | Gln | His | Ala | | |
| | | | 225 | | 230 | | | | 235 | | | | | | 240 | | |
| CCT | TCC | TAT | CCT | GGG | GTG | GAA | CAT | GTT | GGG | GGA | GAT | ATG | TTT | GAA | AGT | 768 | |
| Pro | Ser | Tyr | Pro | Gly | Val | Glu | His | Val | Gly | Gly | Asp | Met | Phe | Glu | Ser | | |
| | | | | 245 | | | | 250 | | | | | 255 | | | | |
| GTT | CCA | GAA | GGA | GAT | GCT | ATT | TTT | ATG | AAG | TGG | ATT | CTT | CAT | GAC | TGG | 816 | |
| Val | Pro | Glu | Gly | Asp | Ala | Ile | Phe | Met | Lys | Trp | Ile | Leu | His | Asp | Trp | | |
| | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | | | | |
| AGT | GAT | AGT | CAC | AAC | CTC | AAG | TTG | CTA | AAG | AAC | TGC | TAC | AAG | GCT | CTA | 864 | |
| Ser | Asp | Ser | His | Asn | Leu | Lys | Leu | Leu | Lys | Asn | Cys | Tyr | Lys | Ala | Leu | | |
| | | | 275 | | | | 280 | | | | | 285 | | | | | |
| CCA | GAC | AAT | GGA | AAG | GTG | ATT | GTT | GTT | GAG | GCC | ATT | TTA | CCA | GTG | AAA | 912 | |
| Pro | Asp | Asn | Gly | Lys | Val | Ile | Val | Val | Glu | Ala | Ile | Leu | Pro | Val | Lys | | |
| | | | 290 | | | 295 | | | | | 300 | | | | | | |
| CCA | GAC | ATT | GAC | ACC | GCA | GTG | GTT | GGC | GTT | TCG | CAA | TGT | GAT | TTG | ATC | 960 | |
| Pro | Asp | Ile | Asp | Thr | Ala | Val | Val | Gly | Val | Ser | Gln | Cys | Asp | Leu | Ile | | |
| | | | 305 | | 310 | | | | 315 | | | | | 320 | | | |
| ATG | ATG | GCT | CAA | AAT | CCT | GGA | GGC | AAA | GAG | CGA | TCG | GAA | GAG | GAG | TTT | 1008 | |
| Met | Met | Ala | Gln | Asn | Pro | Gly | Gly | Lys | Glu | Arg | Ser | Glu | Glu | Glu | Phe | | |
| | | | 325 | | | | | 330 | | | | | | 335 | | | |
| CGA | GCC | TTG | GCT | ACT | GAA | GCT | GGA | TTC | AAA | GGC | GTT | AAC | TTA | ATA | TGT | 1056 | |
| Arg | Ala | Leu | Ala | Thr | Glu | Ala | Gly | Phe | Lys | Gly | Val | Asn | Leu | Ile | Cys | | |
| | | | 340 | | | | 345 | | | | | 350 | | | | | |
| TGT | GTC | TGT | AAT | TTT | TGG | GTC | ATG | GAA | TTC | TGC | AAG | TAG | | | | 1095 | |
| Cys | Val | Cys | Asn | Phe | Trp | Val | Met | Glu | Phe | Cys | Lys | | | | | | |
| | | | 355 | | | 360 | | | | | | | | | | | |

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 22 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique n° 1

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

CGTTTCGCAA TGTGATTGA TC

22

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 23 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique n° 2

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

CTCAAAATGA CATCCTTTCA TAC

23

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 25 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique n° 3

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

CTGAAGATGT CAATAGTTGC ATGGC

25

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 33 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique PAS1

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

GGTCTAGAGG GCCTTTTAGA GTGTTTTTGT TAG

33

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 29 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique PS1

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

AAAGTCGACC GTCCACCTGT GCCAACAAT

29

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 9:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 24 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique PS2

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

TGTTTGGTGT TATGCTTCCG TCCT

24

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 10:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 292 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique PS3

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

AAAAAGCTTT TTTAGGATGG AGTACAGCC

29

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 11:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 29 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

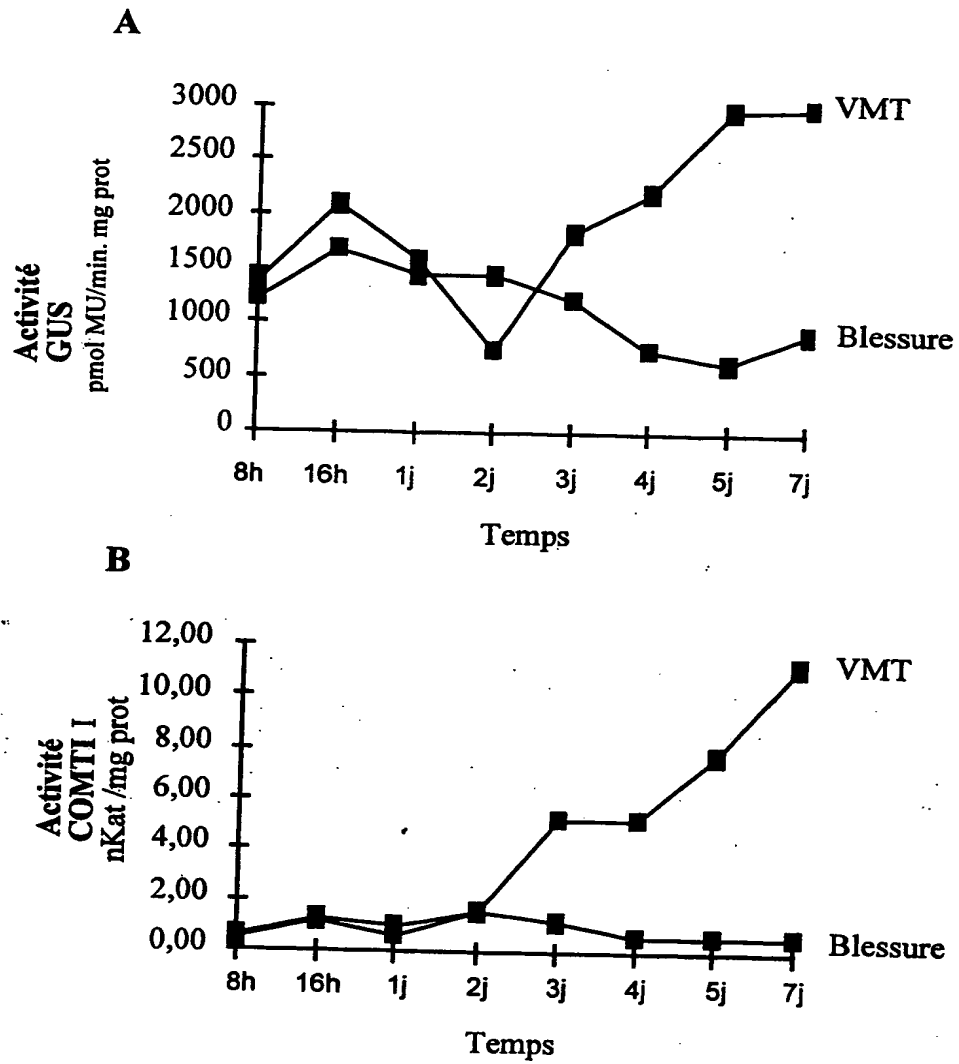
(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique PS4

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

TTTAAGCTTA AAGAGAACCA GACAATATT

29

1/1

**Fig 1**

1. The first part of the document is a list of the names of the persons who were present at the meeting. The names are listed in alphabetical order.

2.

3.